

Proteína relacionada à patogênese *TcPR10* de *Theobroma cacao*: mecanismos de ação contra fungos

Melo, SA¹; Silva, AC²; Cardoso, TH¹; Pungartnik, C¹; Gramacho, K⁴; Micheli, F^{1,3}; Brendel, M¹; Cascardo, JCM¹; Gesteira, AS¹

¹Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, UESC, Ilhéus-BA; ²Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador-BA, Brazil; ³CIRAD-BIOS, UMR DAP, Montpellier, France; ⁴CEPEC, CEPLAC
sarahgenetica@yahoo.com.br

Palavras-chave: PR10; interação planta-patógeno, atividade antifúngica, FITC

Um clone de cDNA de *Theobroma cacao* (*Tc*) que codifica uma proteína relacionada a patogênese (*TcPR10*) foi isolado de uma biblioteca de cDNA de meristemas apicais inoculados com fungo *Moniliophthora perniciosa* (*Mp*). Este gene foi clonado em vetor de expressão pET28a e a proteína recombinante foi obtida. A proteína recombinante *TcPR10* purificada apresentou massa molecular de aproximadamente 19 kDa. A caracterização das propriedades enzimáticas de *TcPR10* indica que esta proteína recombinante exibe atividade antifúngica contra *Mp*. A sensibilidade das hifas dicarióticas e monocarióticas de *Mp* à proteína foi avaliada em meio sólido contendo de 0,0 a 8,0 µg de *TcPR10*. A taxa de sobrevivência, para maior dose, foi de aproximadamente 3 e 15% para hifas mono- e di-carióticas, respectivamente. Em ambas as formas de vida do patógeno observa-se uma relação dose X resposta. As mesmas doses de proteínas foram utilizadas para avaliar a taxa de inibição de formação do tubo germinativo de basidiósporos de *Mp*. A taxa de inibição para maior dose foi de 80%. A inibição de formação de tubo germinativo dos basidiósporos está correlacionada com a habilidade dos basidiósporos formarem colônias, mostrando claramente que o modo de ação de *TcPR10* não é citostático e sim citotóxico. A proteína *TcPR10* marcada com FITC foi utilizada para monitorar o seu transporte para o citoplasma do fungo *Mp*, num período de 0 a 6 horas. É possível verificar que o transporte desta proteína inicia-se após 15 minutos de incubação com as células do fungo. Entretanto, danos na membrana do fungo são visualizados após 1 hora de incubação das células do fungo com a proteína na presença de iodeto de propídeo, corante que demonstra a integridade celular. A proteína recombinante também apresenta atividade de ribonuclease da *TcPR10* contra RNA total de *Mp*. Estes resultados sugerem que a função de ribonuclease da *TcPR10* é essencial para sua atividade antifúngica e sua penetração na célula do fungo provavelmente ocorre por processo ativo. Foi feita análise da atividade antifúngica utilizando mutantes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de elucidar o modo de transporte da proteína para meio intracelular. Utilizando o marcador fluorescente FITC associado a proteína foi observado que células de levedura em fase estacionária de crescimento não importam esta proteína, enquanto células em fase exponencial de crescimento expostas a 15 min de tratamento já estão marcadas. O mutante *atr1/snq3*, defeitivo no transporte (efluxo) de drogas do tipo aminotriazóis, é mais sensível em pequenas doses quando comparado ao seu selvagem. Isto significa que possivelmente este tipo de transporte está envolvido na exportação desta proteína para fora da célula.

Suporte Financeiro: CNPq, IFS, CAPES.